



UNIVERSITAS SURABAYA
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

GEDUNG PERPUSTAKAAN Lt. 4
JALAN RAYA KALIRUNGKUT (TENGGILIS), SURABAYA, 60293
TELP. (031) 2981360, 2981365 FAX. (031) 2981363

SURAT TUGAS

Nomor : 10/Lit/LPPM/DIKTI/MIPA/II/2012

Atas dasar Surat Perjanjian nomor 0008/SP2H/PP/K7/KL/II/2012 tertanggal 9 Februari 2012 tentang Pelaksanaan Hibah Program Penelitian Multi Tahun dan Desentralisasi Tahun Anggaran 2012, dengan ini Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Surabaya memberi tugas kepada :

1. Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D. ✓
2. Arief Budhyantoro, S.Si., M.Si.
3. Ruth Chrisnasari, M.P

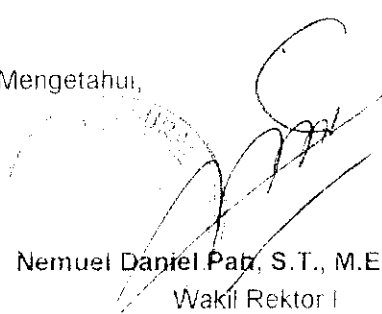
untuk melaksanakan penelitian Program Hibah Desentralisasi Penelitian Hibah Bersaing berjudul :
Pembuatan Wafer Enzim Glukosa Oksidase Terimobilisasi Pada Bentonit Alam Termodifikasi dan Pemanfaatannya Sebagai Biokatalis dalam Bioreaktor

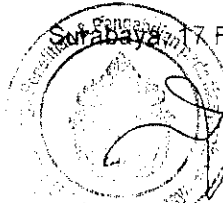
dengan waktu pelaksanaan penelitian mulai **9 Februari 2012** (sesuai dengan surat perjanjian dengan Dikti/ Kopertis VII) sampai dengan **30 Nopember 2012**, dengan anggaran sebesar : **Rp. 30.000.000,-** (Tiga Puluh Juta Rupiah)

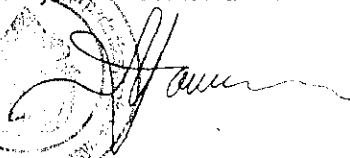
Penerima tugas wajib mengikuti segala aturan yang dikeluarkan oleh DIKTI/ Kopertis VII dan/atau Universitas Surabaya.

Demikian Surat Tugas ini dibuat untuk dilaksanakan sebaik-baiknya.

Mengetahui,


Nemuel Daniel Patu, S.T., M.Eng, Ph.D.
Wakil Rektor I

 17 Februari 2012


Dr. Yoan Nursari Simanjuntak, S..H., M.Hum.
Ketua

Tembusan :

1. Dekan Fakultas Teknobiologi Ubaya,
2. Kepala Departemen MIPA Ubaya,
3. Direktur Keuangan Ubaya,
4. Kepala Biro Adpesdam Ubaya,
- ⑤ Yang bersangkutan

**LAPORAN PENELITIAN
HIBAH BERSAING PERGURUAN TINGGI**

Tahun Anggaran 2012/2013



**PEMBUATAN WAFER ENZIM GLUKOSA OKSIDASE
TERIMOBILISASI PADA BENTONIT ALAM
TERMODIFIKASI DAN PEMANFAATANNYA SEBAGAI
BIOKATALIS DALAM BIOREAKTOR**

Peneliti Utama:

Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D.

Anggota Peneliti:

Arief Budhyantoro, S.Si., M.Si.

Ruth Chrisnasari, S.TP., M.P.

**UNIVERSITAS SURABAYA
NOVEMBER 2012**

HALAMAN PENGESAHAN USUL HIBAH BERSAING

1. Judul : Pembuatan *Wafer* Enzim Glukosa Oksidase
Terimobilisasi Pada Bentonit Alam
Termodifikasi dan Pemanfaatannya Sebagai
Biokatalis dalam Bioreaktor
2. Ketua Peneliti
- a. Nama lengkap : Restu Kartiko Widi. S.Si., M.Si., Ph.D
- b. Jenis Kelamin : Laki-laki
- c. NPK : 199024
- d. Jabatan Struktural : -
- e. Jabatan Fungsional : Lektor. III d
- f. Fakultas/Jurusan : Departemen MIPA
- g. Pusat Penelitian/Perguruan Tinggi : Universitas Surabaya
- h. Alamat : Jl. Raya Kalirungkut Tenggilis Gd TG Lt. 6
Surabaya
- i. Telp./Faks : 031- 2981398 / 031-2981387
- j. Alamat Rumah : Jl. Jambangan Kebon Agung 1A/6 Surabaya
- k. Telp./Faks/email : 081615260956/restu @ ubaya.ac.id
3. Jangka Waktu Penelitian : 2 tahun
4. Pembiayaan
- a. Jumlah biaya yang diajukan ke Dikti : Rp. 100.000.000,-
- b. - Jumlah biaya tahun ke 1 yang diajukan ke Dikti : Rp. 50.000.000,-
- Jumlah biaya tahun ke 1 yang disetujui Dikti : Rp. 30.000.000,-
- Jumlah biaya tahun ke 2 yang diajukan ke Dikti : Rp. 50.000.000,-
- Jumlah biaya yang diajukan ke Instansi Lain : Rp. -

Surabaya, 15 Nopember 2012

Mengetahui,

Ketua Departemen MIPA

(Joice Ruth Juliana. S.Si., M.Si)

NPK: 198033

Ketua Peneliti,

(Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D)

NPK: 199024

Menyetujui,

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Surabaya

(Dr. Yoan Nursari Simanjuntak, SH, M.Hum.)

NPK: 196008



Penelitian ini telah didokumentasikan
di Perpustakaan UBAYA

LP Tek 89

Direktur Perpustakaan,

Enhesri Tarigan, M.Eng, Ph.D

IDENTITAS PENELITIAN

1. Judul Penelitian : Pembuatan *Wafer* Enzim Glukosa Oksidase Terimobilisasi Pada Bentonit Alam Termodifikasi dan Pemanfaatannya Sebagai Biokatalis dalam Bioreaktor

2. Penanggung Jawab Program

Nama : Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D.
Bidang Keahlian : Rekayasa Material Berpori, Adsorpsi dan Katalis
Jabatan struktural : -
Jabatan fungsional : Dosen dan Peneliti
Unit Kerja : Dep. MIPA, Fakultas Teknik
Perguruan Tinggi : Universitas Surabaya
Alamat Surat : Kampus Ubaya Tenggilis, Jl. Raya Kalirungkut, Surabaya 60293
Telepon : 031-2981398
Faksimili : 031-2981387
e-mail : restu@ubaya.ac.id

3. Anggota Peneliti :

No.	Nama dan Gelar Akademik	Bidang Keahlian	Instansi	Alokasi Waktu	
				Jam/mg	Bulan
1.	Arief Budhyantoro, S.Si., M.Si.	Rekayasa Material Berpori dan Adsorpsi	Dep. MIPA, Fak. Teknik Universitas Surabaya	8	10
2.	Ruth Chrisnasari, M.P	Bioteknologi dan Teknologi Enzim	Fakultas Teknobiologi Universitas Surabaya	8	10

4. Obyek Penelitian : Bentonit Alam Pacitan dan Enzim Glukosa Oksidase untuk dibuat dalam bentuk wafer sebagai bahan elektrode untuk uji kadar glukosa darah

5. Masa Pelaksanaan Penelitian :

Mulai : Maret 2012
Berakhir : November 2012

6. Anggaran yang diperoleh:
Tahun pertama : **Rp. 30.000.000**

7. Lokasi Penelitian : Lab. Kimia Dept MIPA dan Lab Purifikasi dan Biologi Molekuler (Jurusan Biologi UBAYA)

ABSTRAK

Pemanfaatan enzim Glukosa Oksidase (GOD) terus berkembang baik dalam bidang industri maupun dalam bidang medis. Glukosa oksidase digunakan secara luas untuk determinasi keberadaan glukosa bebas dalam darah (reagen pendiagnosa penyakit), biosensor, sebagai zat aditif pada industri makanan, produksi asam glukonat, sebagai bahan tambahan dalam pasta gigi dan pembuatan roti. Secara teknis sangat sulit untuk memisahkan enzim dan produk dan mendapatkan kembali enzim yang aktif diakhir reaksi, sehingga dilakukan imobilisasi enzim. Salah satu bahan alam yang dapat digunakan untuk imobilisasi adalah bentonit. Bentonit memiliki karakteristik yang sesuai dengan material imobilisator dan terdapat melimpah di Indonesia. Untuk meningkatkan kemampuan bentonit dalam mengimobilisasi enzim, dilakukan modifikasi bentonit berupa pengasaman dan interkalasi menggunakan surfaktan berupa TetraMetil Amonium Hidroksida (TMAOH). Modifikasi dengan asam akan

menyebabkan struktur bentonit menjadi lebih aktif karena pengotor pada kisi-kisi bentonit akan lepas dalam larutan asam dan bentonit akan terlapisi oleh lapisan H^+ yang dapat digunakan dalam mengimobilisasi enzim.

Hingga saat laporan ini disusun, telah dilakukan proses imobilisasi enzim GOD pada bentonit yang telah dimodifikasi melalui pengasaman dan penambahan surfaktan TMAOH. Karakterisasi enzim GOD terimobilisasi juga sudah dilakukan menggunakan FTIR dan XRD, dan hasil analisa datanya juga telah disusun. Penentuan kondisi terbaik untuk tiap proses imobilisasi dan analisa datanya telah dilakukan. Dengan demikian untuk kegiatan tahun I sesuai yang tertulis di proposal telah selesai dikerjakan dan sesuai dengan usulan. Namun demikian luaran penelitian berupa artikel masih dalam tahap submit sehingga belum terpublikasi. Untuk pengajuan paten sampai saat ini masih dalam tahap penelusuran dan pencarian informasi terkait topik penelitian dan pengajuan paten.

Dari hasil penelitian yang telah diperoleh, proses terimobilisasi dapat berpengaruh pada karakter pH, suhu maupun nilai K_m dan V_{max} dari enzim GOD. Namun, pada GOD terimobilisasi bentonit termodifikasi asam memiliki karakter pH dan suhu yang sama dengan enzim GOD bebas, dimana pH terbaik adalah 5,5 hingga 7 dan suhu terbaik adalah 30°C hingga 40°C. Selain itu, diketahui bahwa nilai K_m dan V_{max} dari enzim GOD terimobilisasi bentonit termodifikasi asam mengalami penurunan $\pm 1/2$ kali dari nilai K_m dan V_{max} enzim bebas yang berarti bahwa proses imobilisasi akan menurunkan laju reaksi enzim GOD. Nilai K_m dari enzim GOD terimobilisasi bentonit termodifikasi asam adalah 8609,1087 mg/L dan nilai V_{max} sebesar 0,18342229 mg/L.min. Sedangkan nilai K_m dan V_{max} dari enzim GOD bebas adalah 5471,7507 mg/L dan 0,25369764 mg/L.min. Pada penelitian ini juga dilakukan penentuan jumlah pemakaian (*cycle*) dari enzim GOD terimobilisasi bentonit. Diketahui bahwa enzim GOD terimobilisasi ini dapat digunakan sebanyak 7 kali dengan penurunan aktivitas sebesar $\pm 30\%$. Hal ini menunjukkan bahwa enzim GOD terimobilisasi ini cukup stabil.

Penelitian berikutnya dilakukan untuk menentukan konsentrasi TMAOH terbaik agar bentonit dapat mengimobilisasi GOD, suhu dan pH terbaik, nilai K_m dan V_{max} dari enzim GOD terimobilisasi pada bentonit termodifikasi TMAOH konsentrasi terbaik, serta jumlah pemakaian maksimumnya. Hasilnya, diketahui konsentrasi TMAOH yang terbaik adalah TMAOH 5% (v/v), suhu terbaik enzim GOD terimobilisasi pada bentonit termodifikasi TMAOH 5% adalah pada suhu 40-50°C, sedangkan pH terbaiknya adalah pH 7. Sementara nilai V_{max} enzim GOD terimobilisasi adalah 0,169768 ppm/menit, dengan K_m sebesar 4438,069 ppm. Selain itu, diketahui bahwa enzim GOD terimobilisasi pada bentonit termodifikasi TMAOH 5% dapat digunakan sebanyak 6x hingga aktivitasnya menurun sebanyak 39,44%.

Kata kunci: *imobilisasi, glukosa oksidase, bentonit, aktifitas enzim*

BAB I. PENDAHULUAN

Latar Belakang

Penderita kencing manis (diabetes) di Indonesia mencapai 14 juta orang yaitu sekitar 6,4% dari penduduk Indonesia. Indonesia menduduki ranking keempat terbesar di dunia dalam jumlah penderita diabetes (Adrian, 2010). Dalam diagnosis dan pencegahan penyakit ini, perkiraan glukosa di dalam darah penderita diabetes menjadi parameter penting. Beberapa biosensor dengan metode enzimatik telah dikembangkan dewasa ini. Penelitian terus dilakukan dengan bahan dan pendekatan yang baru sehingga sensitivitas dan stabilitas dari sensor dapat dikembangkan.

Glucose oxidase (GOD) adalah enzim yang diisolasi dari *Penicilium* dan *Aspergillus niger*. Enzim ini mengkatalisa reaksi oksidasi β -D-glucose menjadi δ -gluconolactone dan memproduksi H_2O_2 . Oleh karena itulah GOD seringkali digunakan untuk memonitor konsentrasi glukosa dalam darah (Libertino, 2008).

Penggunaan enzim glukosa oksidase selama ini memiliki kelemahan yaitu seringnya terjadi denaturasi termal yang disebabkan oleh ketidakstabilan interaksi ionik-hidrofobik dan putusannya ikatan hidrogen, gaya Van der Waals dan interaksi ionik yang selanjutnya mengakibatkan perubahan konformasi struktur tersier enzim sehingga mengakibatkan berkurangnya atau bahkan menghilangnya aktifitas enzim GOD (Sarath *et al.*, 2004). Salah satu cara mengatasi kelemahan tersebut adalah melalui imobilisasi enzim yaitu mengikat enzim pada bahan pendukung (matriks) sehingga tidak bebas bergerak, namun tidak kehilangan aktifitas katalisisnya dan dapat digunakan secara berulang (Chibata, 1978).

Bentonit adalah salah satu jenis *clay* yang merupakan polimer alam silika-alumina yang tersusun atas struktur lapisan-lapisan. Di Indonesia, produksi bentonit sangat berlimpah dan konsumsi bentonit masih terbatas pada keperluan berteknologi rendah. Oleh karena itu, pemanfaatan bentonit sebagai matriks dalam imobilisasi glukosa oksidase merupakan hal yang menarik untuk diteliti. Material bentonit dalam penelitian ini terlebih dahulu dimodifikasi dengan proses pengasaman dan interkalasi menggunakan kation organik (surfaktan) untuk memperbesar pori diharapkan dapat memerangkap enzim dalam jumlah yang lebih banyak.

Uji aktivitas perlu dilakukan untuk menentukan stabilitas enzim yang diimobil. Selanjutnya hasil terbaik matriks bentonit termodifikasi disintesis ulang dalam skala lebih besar untuk dibentuk *wafer* yang dilapisi dengan selulosa asetat dan polikarbonat. Dengan adanya lapisan wafer ini stabilitas GOD akan lebih meningkat, sehingga dapat digunakan sebagai dasar rancangan alat biosensor berbasis elektroda Ekananda (2007). Matriks bentonit termodifikasi ini juga diharapkan dapat dengan mudah diaplikasikan sebagai biosensor alat pengukur kadar glukosa, dengan harga yang lebih murah.

Tujuan Khusus

Tujuan khusus pada penelitian tahun pertama ini adalah dihasilkannya sebuah matriks imobilisasi berupa bentonit termodifikasi asam dan terinterkalasi surfaktan, sehingga matriks diharapkan akan memiliki distribusi ukuran pori ke arah ukuran meso. Matriks bentonit termodifikasi tersebut juga akan dikarakterisasi dan dianalisa struktur biomaterialnya. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan mengoptimasi metode imobilisasi enzim glukosa oksidase (GOD) ke dalam struktur bentonit termodifikasi sebagai padatan pengemban (*solid support*), mengetahui aktivitas katalisis enzim GOD yang terimobilisasi bentonit dalam reaksi oksidasi glukosa, serta menguji aktivitas enzim GOD yang terimobilisasi bentonit jika digunakan secara berulang.

Urgensi (Keutamaan) Penelitian

Penelitian tahun pertama dilakukan untuk mengkaji metode interkalasi bentonit (dari serbuk bentonit alam) sebagai material imobilisasi enzim GOD guna memberikan nilai tambah terhadap hasil tambang bentonit alam Indonesia. Material bentonit dipreparasi melalui proses pengasaman dan interkalasi menggunakan kation organik (*surfactant*). Proses ini bertujuan untuk merubah sifat dasar bentonit alam, seperti luas permukaan dan distribusi ukuran pori ke arah ukuran meso. Dengan meningkatkan performanya diharapkan sifat dan kualitas material yang dihasilkan jauh lebih baik daripada bentonit alam langsung tanpa proses preparasi awal sebagai material untuk memerangkap enzim GOD. Material imobilisasi enzim yang telah dibuat dikarakterisasi menggunakan FT-IR dan *Difraksi sinar-X (XRD)*. Uji aktifitas enzim GOD yang telah terimobilisasi juga telah dilakukan.

Pentingnya penelitian ini adalah memberikan manfaat yang besar karena menggunakan bahan dasar dari bahan alam yang ada di Indonesia sehingga mampu memberikan nilai tambah terhadap bahan alam yang melimpah di Indonesia. Dengan dibuatnya matriks enzim GOD, maka diharapkan hasil penelitian ini selanjutnya dapat diterapkan dalam pembuatan wafer untuk biosensor uji kadar gula darah. Secara keseluruhan manfaat yang dapat disumbangkan melalui penelitian tahun pertama ini adalah: (i) diperolehnya teknologi sintesis material berbahan dasar alam yang melimpah; (ii) mendorong peningkatan ilmu pengetahuan dan teknologi terutama di bidang nanomaterial di Indonesia.

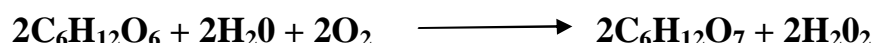
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

Enzim adalah suatu katalis biologis, yaitu suatu senyawa protein yang dapat mengkatalisis reaksi biologis dalam tubuh manusia, hewan maupun tumbuhan. Kebanyakan enzim diberi nama menurut reaksi yang dikatalisisnya, dan seringkali diberi akhiran –ase. Enzim memiliki berat molekul mulai dari 12.000 – 120.000 bahkan ada yang lebih tinggi. Enzim kebanyakan bekerja dalam tubuh makhluk hidup pada suhu normal tubuh dan dalam media berair.

Pada beberapa dekade yang lalu ide untuk melakukan reaksi enzimatik pada media *non-aqueous* sepertinya merupakan ide yang hampir mustahil untuk mewujudkannya. Namun dalam kurun waktu beberapa tahun terakhir pendekatan pemanfaatan enzim untuk mengkatalisis berbagai proses kimia dalam media organik telah banyak dilakukan. Masalah yang paling sering muncul pada aplikasi reaksi enzimatik seperti ini adalah adanya pengaruh media organik terhadap aktifitas enzim. Interaksi secara langsung antara enzim dengan media organik mempengaruhi konformasi aktifitas enzim sehingga dapat menurunkan aktifitasnya. Imobilisasi enzim merupakan salah satu metode yang paling menjanjikan untuk mencegah penurunan aktifitas enzim dalam pelarut organik (Elena *et al.*, 2005).

Imobilisasi enzim didefinisikan sebagai enzim-enzim yang secara fisik berada dalam suatu tempat/lokasi tertentu sehingga tidak bebas bergerak, namun tidak kehilangan aktifitas katalisisnya dan dapat digunakan secara berulang (Chibata, 1978). Pemanfaatan imobilisasi enzim memberikan peluang untuk meningkatkan stabilitas enzim pada konsentrasi pelarut organik yang tinggi. Imobilisasi mencegah interaksi protein-protein yang dapat menyebabkan terjadinya agregasi molekul protein sehingga pada akhirnya menyebabkan timbulnya deaktivasi enzim (Vasileva and Godjevargova, 2005). Dengan karakteristiknya yang masih seperti enzim asalnya memberikan keunggulan tersendiri terhadap proses imobilisasi tersebut, yaitu enzim dapat digunakan dalam proses katalisis secara berulang dan berkesinambungan.

Salah satu enzim yang sering menjadi perhatian adalah enzim glukosa oksidase (GOD) (EC 1.1.3.4) berkenaan dengan pemanfaatannya yang besar dalam reagen pendiagnosa penyakit, biosensor, zat aditif makanan, reagen analitik dan sebagainya (Iwuoha and Smyth, 1994; Larreta-Garde *et al.*, 1987; Raba and Motolla, 1995). Enzim ini banyak dihasilkan oleh *Penisillium* dan *Aspergillus niger* (Raba and Motolla, 1995). Enzim GOD adalah suatu enzim oksido-reduktase yang mengkatalisis oksidasi glukosa menjadi hidrogen peroksida dan D-glucono- δ -lactone. Secara umum reaksi yang dikatalisa enzim GOD seperti tersaji pada Skema 1.



Skema 1. Reaksi Oksidasi glukosa oleh Enzim Glukosa Oksidase

Enzim GOD umumnya memiliki kurva aktivitas berkisar pada pH 4,5-7,5 dan suhu 30-60 °C. Peningkatan suhu sampai 70 °C akan menurunkan aktivitasnya dan tidak ada aktivitas pada suhu 80 °C (Whittaker *et al.*, 2003). Denaturasi termal GOD seringkali disebabkan oleh ketidakstabilan interaksi ionik-hidrofobik dan putusannya ikatan hidrogen, gaya Van der Waals dan interaksi ionik yang selanjutnya mengakibatkan perubahan konformasi struktur tersier enzim sehingga mengakibatkan berkurangnya atau bahkan menghilangnya aktifitas enzim GOD (Sarath *et al.*, 2004; Tsuge *et al.*, 1975). Oleh karena itu, bagaimana enzim GOD terikat dengan bahan pengimobilisasinya sangat berperan dalam proses imobilisasi dan aktifitasnya. Beberapa tahun belakangan ini uji yang melibatkan imobilisasi enzim GOD telah banyak dilakukan. Salah satu yang menjadi perhatian utama dalam uji tersebut adalah stabilitas enzim dalam pelarut organik dan pada suhu tinggi (Mozhaev *et al.*, 1989).

Terdapat beberapa teknik imobilisasi enzim mulai dari pembentukan ikatan kovalen hingga pemerangkapan molekul enzim secara fisik dalam suatu material (Trevan, 1980). Material yang digunakan sebagai bahan pemerangkap enzim (*enzym support*) dapat memberikan pengaruh yang besar terhadap stabilitas enzim dan efektifitas imobilisasi enzim. Karakteristik yang paling penting bagi material yang dipergunakan sebagai *support* adalah tidak larut dalam air, memiliki kapasitas yang besar dalam mengikat enzim, stabil dan tidak

mudah bereaksi (*chemically inert*). Kapasitas pengikatan enzim ini ditentukan oleh ketersediaan area permukaan baik secara internal (ukuran pori) maupun eksternal (ukuran partikel), dan kemudahan proses aktivasi (Worsfold, 1995).

Salah satu material yang dapat digunakan sebagai bahan pemerangkap enzim adalah polimer anorganik seperti lempung (*clay*). Sanjay dan Sugunan (2005) melakukan imobilisasi enzim invertase menggunakan montmorillonite K-10 melalui dua metode yaitu metode adsorpsi dan metode ikatan kovalen dan menunjukkan bahwa efisiensi imobilisasi enzim tersebut masih di bawah 40%. Sedangkan penggunaan penyangga polimer (*polymer support*) untuk imobilisasi enzim tersebut juga telah dilaporkan oleh Isik *et al* (2003) dan Cirpan *et al* (2003).

Material sejenis yang memiliki potensi untuk digunakan sebagai bahan imobilisasi enzim adalah bentonit mengingat bahwa bentonit memiliki karakteristik yang sesuai dengan material imobilisator dan terdapat melimpah di Indonesia. Bentonit adalah salah satu jenis lempung (*clay*) yang merupakan polimer silika-alumina yang tersusun atas struktur lapisan-lapisan. Indonesia merupakan salah satu sumber dan sekaligus konsumen bentonit yang cukup besar. Pada umumnya masyarakat penambang tradisional menjualnya dengan harga relatif murah dan menggunakannya untuk keperluan sederhana berteknologi rendah. Hal ini cukup disayangkan, karena bentonit menyimpan potensi besar untuk dimanfaatkan secara lebih maju. Oleh karena itu, diperlukan suatu usaha untuk meningkatkan nilai tambahnya.

Lapisan-lapisan bentonit tersusun atas tetrahedral silikat (SiO_4) pada bagian luar dan octahedral AlO_6 pada bagian dalamnya. Adanya struktur polimer silika-alumina tersebut, lempung (*clay*) memiliki muatan permukaan negatif (dan mempunyai sifat keasaman yang cukup tinggi) sehingga memiliki kemampuan untuk mengikat kation dan molekul air. Selain itu lempung juga mampu mengikat molekul organik melalui proses *entrapment* dan interaksi van der Waals biasa. Namun demikian adanya struktur lapisan pada lempung mengakibatkan lempung memiliki sifat *swelling* yaitu kemampuan untuk mengembang dan mengempis berdasarkan ukuran molekul yang masuk kedalam struktur antar lapisannya. Sifat ini terutama tampak dengan keberadaan molekul air pada struktur lapisan tersebut yang mudah diserap dan dilepas pada saat proses kalsinasi akan sangat berpengaruh terhadap *swelling* struktur antar lapisan tersebut. (Pinnavaia, 1983; Vaughan, 1988; Hutson, 1998; Cool and Vansant, 1998; Clearfield, 1998; Sarikaya *et al.*, 2000). Hal ini mengakibatkan lempung memiliki kapasitas adsorpsi yang relatif rendah.

Untuk meningkatkan kemampuan mengikat molekul organik pada lempung guna meningkatkan nilai tambahnya, beberapa peneliti telah melakukan beberapa usaha antara lain menginterkalasi lempung dengan molekul organik (kationik, anionik dan non ionik molekul). Proses ini mengakibatkan jarak antar lapisan lempung menjadi lebih besar, sehingga lempung cenderung membentuk pori berukuran meso (20-60 Å). Akibatnya lempung memiliki sifat selektifitas yang baik terhadap molekul berukuran besar, terutama molekul organik. (Cool and Vansant; Polverejan, 2000; Moreno *et al.*, 1999; Hutson *et al.*, 1999; Khaorapapong *et al.*, 2002; He *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2004; Slade and Gates, 2004).

Beberapa peneliti memanfaatkan lempung hasil interkalasi sebagai katalis, seperti dalam reaksi asilasi amina (Choudary *et al.*, 2001), sintesis tocopherols (US Patent 5610113), beberapa reaksi polimerisasi (US Patent 6495511), kondensasi langsung asam karboksilat dengan alkohol (Kantam *et al.*, 2001), silasi benzena (Vasant *et al.*, 2001). Selain itu juga telah ada peneliti yang memanfaatkan jenis lempung montmorillonite K-10 sebagai bahan pemerangkap enzim invertase (Sanjay dan Sugunan, 2005).

Penelitian ini akan mengoptimalkan sifat dasar bentonit yaitu keasaman permukaannya dan meningkatkan ukuran pori bentonit sampai di ukuran meso (20 – 60 Å), untuk digunakan sebagai bahan pengimobilisasi enzim dengan menjebak molekul enzim dalam pori bentonit, sehingga diharapkan molekul enzim (dalam hal ini adalah enzim GOD) tidak mudah terlepas atau berkurang selama proses katalitiknya, namun tidak menyebabkan molekul enzim kehilangan aktifitasnya. Perbedaan mendasar dari penelitian yang diusulkan dengan penelitian terdahulu baik yang telah dilakukan oleh pengusul maupun peneliti lain adalah terletak pada proses interkalasi lempung, surfaktan yang digunakan, sumber bentonit, serta pemanfaatannya sebagai bahan imobilisasi enzim GOD. Pemanfaatan jenis lempung sebagai bahan

pemerangkap enzim penah dilakukan oleh Sanjay dan Sugunan (2005), namun jenis lempung yang digunakan adalah montmorillonite K-10 sintetis tanpa proses interkalasi serta enzim yang digunakan adalah enzim invertase.

Beberapa penelitian pendahuluan yang telah dikerjakan oleh tim peneliti untuk menunjang penelitian ini secara langsung adalah: Pillarisasi bentonit alam menggunakan logam Al dan Fe dan aplikasinya sebagai katalis (Arief dkk, 2004); Modifikasi zeolit alam menggunakan surfaktan HDTMA dan aplikasinya dalam proses adsorpsi fenol dalam sistem larutan (Arief dkk. 2004); Pillarisasi dan karakterisasi struktur bentonit alam-surfaktan terpillar logam Al, Fe dan campuran logam Al-Fe (2005), serta pemanfaatannya sebagai katalis hidroksilasi fenol (2006), sebagai adsorben ion Cr (Arief, dkk, 2007), sebagai adsorben ion Cu (Restu dan Arief, 2007), dan sebagai katalis reaksi esterifikasi asam lemak (Restu dan Arief, 2009).

Penelitian ini dimaksudkan untuk meningkatkan nilai tambah bentonit alam sebagai material dalam proses imobilisasi enzim. Kajian yang dilakukan terhadap bentonit pada umumnya ditekankan terhadap dua hal, yaitu bagaimana mendapatkan ukuran pori bentonit yang berukuran meso (20-60 Å) atau lebih dan menjaga kestabilannya, serta mengoptimalkan sifat asam permukaannya. Ruang lingkup penelitian ini adalah bidang rekayasa material lempung melalui proses interkalasi dan pengasaman untuk dipergunakan sebagai material imobilisasi enzim GOD. Proses modifikasi bentonit melalui interkalasi dimaksudkan untuk meningkatkan ukuran pori bentonit mengingat bahwa penjerapan enzim GOD dalam proses imobilisasi enzim mengambil tempat di permukaan bentonit (baik permukaan luar maupun permukaan di dalam pori), sehingga ukuran pori diupayakan agar dapat dimasuki oleh molekul enzim GOD. Pada usulan penelitian ini bahan penginterkalasi dibatasi pada surfaktan Trimethylammonium Hidroksida (TMA-OH), dan enzim yang digunakan dibatasi pada enzim Glucose Oxidase (GOD).

Pendekatan yang digunakan sebagai kerangka penyusunan konseptual dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

(i) Proses interkalasi yang dimaksudkan untuk meningkatkan jarak antar lapisan lempung menjadi lebih besar (membentuk pori berukuran meso 20-60 Å) dengan molekul organik (kationik, anionik dan non ionik molekul), didasarkan pada penelitian yang telah dilakukan oleh Cool and Vansant, 1998; Polverejan, 2000; Moreno *et. al.*, 1999; Hutson *et. al.*, 1999; Khaorapapong *et.al.*, 2002; He *et. al.*, 2004; Davis *et.al.*, 2004; Slade and Gates, 2004; Arief, dkk, 2007; Restu dan Arief, 2007.

(ii) Penggunaan bentonit terinterkalasi sebagai material imobilisasi enzim ini didasarkan pada konsep teoritis yang menyatakan bahwa bentonit terinterkalasi akan mempunyai ukuran pori meso 20-60Å yang diharapkan mampu dimasuki oleh molekul enzim GOD sehingga enzim GOD akan terjepit dan tidak bebas bergerak tanpa kehilangan aktifitasnya.

(iii) Penggunaan GOD terimobil bentonit pada skala lebih besar (*scale up*) untuk mengetahui aktivitas, kestabilan dan konsentrasi optimum yang diperlukan untuk mendeteksi kadar gula darah didasarkan pada data kadar gula darah dari *World Health Organization* (WHO).

(iv) Penggunaan bahan pelapis atau membran sebagai dasar rancangan alat biosensor berbasis elektroda. Penggunaan bahan ini didasarkan pada penelitian yang telah dilakukan oleh Ekananda (2007).

BAB III. METODE PENELITIAN

Pekerjaan pada Tahun I penelitian dipusatkan pada proses pembuatan matriks imobilisasi (imobilisator) berupa bentonit termodifikasi asam dan surfaktan, optimasi rasio konsentrasi enzim dan bentonit termodifikasi serta uji aktivitas dan kestabilan GOD terimobilisasi bentonit.

Pada penelitian tahun I dilakukan dalam dua tahapan. Tahap pertama adalah modifikasi bentonit alam asal Kab. Pacitan, Jawa Timur. Pada bagian ini dilakukan proses interkalasi bentonit alam dengan kation molekul surfaktan TMA-OH (Tri Methyl Ammonium Hidroksida), dan proses pengasaman bentonit. Hasil interkalasi dan pengasaman bentonit

digunakan sebagai bahan pengimobilisasi enzim GOD yang selanjutnya dikarakterisasi menggunakan FT-IR dan Difraksi sinar-X (XRD).

Tahap kedua adalah uji aktivitas enzim GOD termodifikasi asam dan terinterkalasi surfaktan. Selain itu juga dilakukan proses optimasi rasio enzim GOD:bentonit pada proses imobilisasi dan diikuti dengan uji aktifitas enzim. Enzim GOD yang terimobilisasi bentonit juga diuji aktivitasnya saat digunakan secara berulang. Hasil reaksi uji aktivitas dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Semua tahapan penelitian baik proses imobilisasi enzim maupun uji aktifitasnya dilakukan di Laboratorium Kimia dan Laboratorium Purifikasi dan Biologi Molekuler Universitas Surabaya, sedangkan untuk karakterisasi FT-IR dilakukan di Teknik Kimia Universitas Surabaya dan XRD dilakukan di Lab. Kimia FMIPA Universitas Airlangga.

3.1. Interkalasi kation organik pada bentonit alam

Dalam proses ini interkalasi dilakukan dengan mencampur larutan surfaktan dan suspensi bentonit, dimana rasio bentonit : Vol. larutan surfaktan = 1gr : 50 ml, sedangkan variasi konsentrasi surfaktan yang digunakan adalah antara 0,75% sampai 5% (b/V). Pada kajian ini digunakan surfaktan Trimethylammonium Hidroksida (TMA-OH). Campuran diaduk selama 5 jam, kemudian dicuci, disaring dan dikeringkan. Hasil interkalasi ini selanjutnya disebut sebagai suspensi bentonit-organik yang akan digunakan pada proses pillarisasi tidak langsung.

3.2. Pengasaman bentonit alam

Pengasaman dilakukan menggunakan larutan HCl 2 M, dengan rasio bentonit : larutan HCl adalah 1 gr : 20 ml. Setelah campuran terbentuk maka campuran tersebut dibiarkan selama 24 jam disertai pengadukan pada suhu kamar. Campuran kemudian dicuci hingga pH air cucian netral, padatan bentonit disaring dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 100 °C.

3.3. Imobilisasi enzim GOD menggunakan bentonit termodifikasi

Proses imobilisasi enzim GOD dilakukan dengan mencampurkan bentonit termodifikasi dalam jumlah setara dengan bufer pospat 0,1 M pH 7 dan larutan enzim GOD. Campuran diaduk menggunakan *water bath shaker* selama 1 jam, dan selanjutnya dilakukan pemisahan menggunakan *centrifuge* pada 1°C selama 1 jam. Protein enzim dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Karakterisasi dilakukan menggunakan metode (i) FT-IR, untuk mengetahui gugus dan perubahan ikatan kimia (ii) difraksi sinar-X, untuk penentuan awal perubahan struktur kristal bentonit.

3.4. Uji aktifitas enzim GOD terimobilisasi

Uji aktifitas enzim GOD terimobilisasi dilakukan dengan mencampur 1ml larutan glukosa (2 gr/L pada 0,2 bufer Tris fosfat pH 7), 0,1 mL larutan *o*-Dianisidin (2 g/L pada 0,2 bufer Tris fosfat pH 7), 0,1 ml horseradish peroksidase (60 unit/ml pada bufer Tris fosfat pH 7), 0,8 ml gliserol, dan 10-20 µl enzim GOD terimobilisasi (10 IU/ml). Campuran kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 30 °C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 2 ml HCl 5M. *o*-Dianisidin teroksidasi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada 525 nm (Whittington *et al*, 1990 dalam Whittaker *et al.*, 2003). Juga dilakukan kondisi reaksi suhu dan pH terbaik dengan cara memvariasikan suhu dan pH.

3.5. Uji kestabilan enzim GOD terimobilisasi

Uji kestabilan enzim GOD terimobilisasi dilakukan dengan dua cara, yaitu:

- 1) Menghitung jumlah enzim yang *leaching* (lepas dari matriks) selama proses imobilisasi yang dilakukan dengan menguji kadar protein dalam supernatan pada proses imobilisasi menggunakan metode Bradford.
- 2) Menguji aktivitas enzim GOD terimobilisasi pada beberapa kali ulangan reaksi serta dilakukan perhitungan nilai K_m dan V_{max} .

Bagan Alir Penelitian

Waktu	Dikerjakan	Luaran	Indikator	Keterangan
Tahun I	<pre> graph TD A[Modifikasi bentonit menggunakan TMA-OH (rasio bentonit:TMAOH)] --> B[karakterisasi] C[Modifikasi bentonit menggunakan HCl (rasio bentonit:HCl)] --> D[karakterisasi] E[Pembuatan matriks bentonit-enzim GOD (rasio bentonit:enz GOD)] --> F[karakterisasi] E --> G[Uji aktifitas] </pre>	<p>Material bentonit termodifikasi dengan porositas terbaik</p> <p>matriks bentonit-enzim terbaik</p>	<p>Data-data material dari FT-IR, XRD</p> <p>Data-data matriks dari FT-IR, XRD Serta data uji aktifitas dan kestabilan (suhu, pH, Km Vmax, cycle) matriks terhadap reaksi hidrolisis glukosa</p>	Menggunakan dana Hibah Bersaing DIKTI

BAB IV. HASIL PENELITIAN

Kegiatan penelitian telah selesai dilakukan. Penyusunan draft artikel untuk dipublikasikan pada jurnal nasional terakreditasi atau jurnal internasional telah selesai dilakukan dan sedang dalam tahap submit. Draft makalah yang dipresentasikan ataupun draft artikel yang lain masih dalam tahap penyusunan. Tahap karakterisasi struktural enzim terimobilisasi menggunakan FTIR spektra dan XRD difraktogram juga telah dilakukan. Analisa data untuk penentuan suhu, pH terbaik, penentuan Km dan Vmax serta cycle enzim terimobilisasi telah selesai dibahas. Berikut adalah laporan ilmiah singkat proses imobilisasi enzim GOD pada bentonit termodifikasi pengasaman dan penambahan surfaktan.

4.1 Imobilisasi Enzim GOD Pada Bentonit Termodifikasi Asam

Bentonit sebesar 140 mesh dimodifikasi menggunakan HCl dengan berbagai konsentrasi yaitu: 1 M, 1,5 M, 2 M, 2,5 M dan 3 M. Bentonit yang telah termodifikasi digunakan untuk imobilisasi enzim GOD. Sebelum dilakukan imobilisasi larutan enzim yang digunakan diukur absorbansinya untuk mengetahui konsentrasi enzim awal dengan menggunakan metode Hartree Lowry. Setelah proses imobilisasi dilakukan, supernatan dari larutan imobilisasi diukur absorbansinya untuk mengetahui enzim bebas yang masih tersisa dengan menggunakan metode Hartree Lowry. Dengan demikian akan diketahui konsentrasi enzim yang terimobilisasi yaitu dengan mengurangi konsentrasi enzim awal dengan konsentrasi enzim bebas. Tabel 1 menunjukkan hasil imobilisasi dengan 3 kali pengulangan.

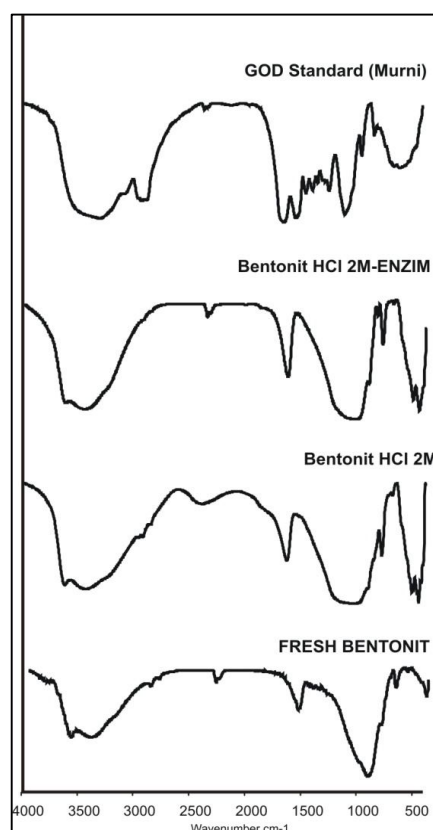
Tabel 1. Hasil imobilisasi bentonit termodifikasi asam HCl

Variasi konsentrasi HCl	Konsentrasi enzim						Terimobilisasi/awal (%)		
	Awal (IU/ml)			Terimobilisasi (IU/ml)					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	10,14	10,14	10,14	1,28	2,11	2,75	12,65	20,78	27,10
1 M	17,92	17,92	10,14	14,38	17,92	10,14	80,22	100	100
1,5 M	17,92	17,92	10,14	16,48	15,66	10,14	91,97	87,37	100
2 M	17,92	17,92	10,14	17,92	17,92	10,14	100	100	100
2,5 M	17,92	16,37	10,14	10,07	11,26	8,43	56,21	68,83	83,10
3 M	17,92	16,37	10,14	12,55	11,72	6,78	70	71,62	66,84

Dari hasil yang diperoleh diketahui bahwa persentase enzim GOD yang terimobilisasi sangat rendah apabila dibandingkan dengan presentase enzim GOD terimobilisasi pada bentonit termodifikasi asam. Adapun rata-rata persentase enzim terimobilisasi pada bentonit tidak termodifikasi sebesar 20,17% sedangkan pada bentonit termodifikasi asam sekitar 69,38% hingga 100%.

4.1.1 Karakterisasi struktur matriks GOD-bentonit termodifikasi asam

Pada bagian ini akan dibahas pengaruh perlakuan bentonit alam menggunakan larutan HCl 2M terhadap perubahan struktur bentonit alam dan kemampuan menyerap sejumlah enzim GOD dalam struktur lapisannya. Gambar 1 menunjukkan Spektrogram FTIR untuk fresh bentonit, bentonit termodifikasi asam (2M) dan GOD terimobilisasi pada bentonit-asam (2M). Pada karakterisasi bentonit alam dengan perlakuan HCl 2M menunjukkan adanya perubahan struktur pori-pori, hal ini ditunjukkan adanya perubahan puncak serapan pada daerah finger print yaitu antara $400 - 550 \text{ cm}^{-1}$; serapan pada daerah kisaran 800 cm^{-1} dan 900 cm^{-1} ; dan perubahan bentuk puncak utama pada daerah $100 - 1100 \text{ cm}^{-1}$. Serapan lain yang memperkuat semakin banyaknya ikatan O-Si-O adalah adanya interaksi ikatan tersebut dengan ion H^+ yang membentuk puncak serapan khas gugus OH pada daerah serapan $3400-3750 \text{ cm}^{-1}$.



Gambar 1 : Spektrogram FTIR bentonit alam dengan perlakuan HCl 2M dan immobilisasi enzim GOD dalam bentonit-HCl 2M.

Puncak serapan pada $400 - 550 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya bentukan *double ring* struktur tetrahedral SiO_4 yang artinya menunjukkan adanya struktur pori-pori dalam bentonit semakin terbuka/ukurannya semakin besar. Hal ini diperkuat dengan semakin tajamnya puncak serapan pada kisaran 800 cm^{-1} dan 900 cm^{-1} , yang merupakan serapan vibrasi rentangan asimetri dari ikatan O-Si-O-Si-O struktur ikatan antar tetrahedral SiO_4 . Fenomena serapan ini menunjukkan jumlah ikatan O-Si-O semakin banyak dan dapat mengalami interaksi dengan ion H^+ dan molekul air.

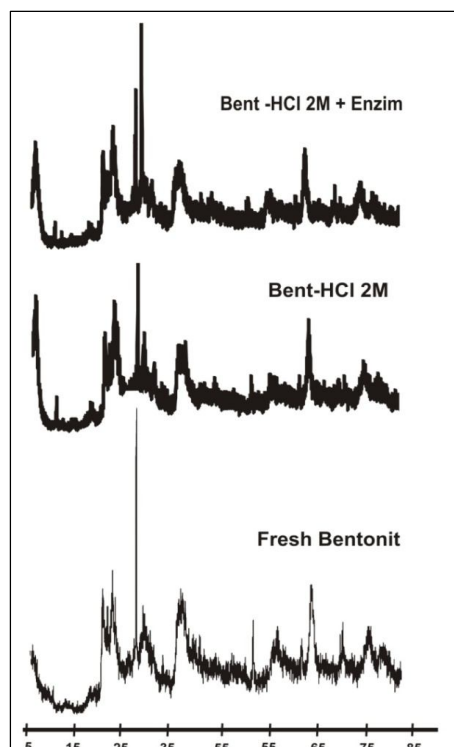
Interaksi antara ion H^+ dan gugus Si-O bentonit ditunjukkan dengan adanya puncak serapan pada kisaran bilangan gelombang $3400 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ dan 1650 cm^{-1} yang semakin lebar dan intensitasnya semakin tinggi dibandingkan dengan bentonit alam. Serapan ini merupakan serapan vibrasi rentangan simetri dari ikatan O---H yang disebabkan oleh adanya ikatan hydrogen Si-O ---- H^+ dari asam HCl dan enzim GOD. Intensitas serapan pada daerah ini paling tinggi dan lebar pada sampel bentonit HCl 2M, sedangkan pada sampel bentonit HCl 2M+Enzim GOD relative lebih rendah intensitasnya. Hal ini disebabkan adanya molekul enzim GOD yang besar mengakibatkan situs aktif ikatan Si-O tertutup dan hanya dapat berintraksi dengan sejumlah kecil atom H pada gugus OH yang ada pada enzim GOD.

Interaksi antara enzim GOD dengan bentonit alam HCl 2M ditunjukkan dengan munculnya puncak serapan pada $790 - 840 \text{ cm}^{-1}$ yang tajam, hal ini menunjukkan adanya vibrasi *stretching* asimetri ikatan Si-O-GOD. Ikatan yang terjadi dimungkinkan adanya ikatan hydrogen yang kuat antara gugus SiO_4 ujung dengan atom H dari gugus glukosa. Hal ini diperkuat dengan adanya data jumlah adsorpsi enzim GOD oleh bentonit-HCl 2M rata-rata 100%, artinya hampir sebagian besar 19,2 IU/ml enzim GOD dalam larutan diserap oleh

bentonit-HCl 2M. Pada fresh bentonit hanya mampu menyerap enzim GOD sebesar 2,11 IU/ml atau rata-rata sebesar 20% dari jumlah enzim GOD dalam larutan awal.

Tabel 2 : Harga 2θ , d dan intensitas puncak difraksi bentonit alam termodifikasi HCl 2M dan enzim GOD.

SAMPEL	2θ	d (Å)	I (count)
Fresh Bentonit	5,92	8,54	355
Bent.-HCl 2M	5,58	15,81	222
Bent.-HCl 2M+GOD	5,78	15,26	161



Gambar 2 : Difraksi sinar-X perubahan struktur bentonit alam menjadi matriks enzim GOD terimobilisasi pada bentonit-HCl 2M

Hasil karakterisasi XRD bentonit-HCl 2M terimobilisasi enzim GOD diberikan pada gambar 2 dan Tabel 2. Immobilisasi enzim GOD dalam bentonit-HCl 2M sangat mungkin dapat terjadi, hal ini ditandai dengan adanya perubahan ukuran pori/jarak antar lapisan bentonit. Pada bentonit-HCl 2M muncul puncak difraksi pada $2\theta = 5,58$ derajat dengan jarak antar lapisan sebesar $15,82 \text{ Å}$, dengan intensitas difraksi sebesar 222 satuan. Jarak antar lapisan tersebut (d) lebih besar dibandingkan dengan jarak antar lapisan pada fresh bentonit alam, yang memiliki harga $d = 8,54 \text{ Å}$, dengan intensitas puncak difraksi sebesar 355 satuan. Pada bentonit-HCl 2M+Enzim terjadi perubahan jarak antar lapisan (d) = $15,26$ dengan harga $2\theta = 5,78$ sedangkan intensitas difraksinya sebesar 161. Ukuran jarak antar lapisan bentonit (d) dan penurunan intensitas difraksi ini

disebabkan adanya sejumlah enzim GOD yang masuk kedalam struktur lapisan bentonit kearah horizontal sehingga jarak antar lapisan semakin kecil dan jumlah ruang kosong yang terukur semakin sedikit karena tertutup oleh enzim GOD terimobilisasi. Selain itu pengaruh HCl 2M juga dapat melarutkan pengotor

pada bentonit alam berupa kwarsa yang ditunjukkan munculnya puncak difraksi pada $2\theta = 27,81$ yang merupakan puncak difraksi utama mineral kwarsa. Hal ini disebabkan dengan adanya larutan HCl 2M ikatan O-Si-O struktur kerangka kwarsa akan terputus, akibatnya kristalinitas akan semakin rendah. Hal ini sangat baik untuk meningkatkan performa bentonit alam dalam menyerap enzim GOD.

4.1.2 Penentuan suhu terbaik

Bentonit termodifikasi yang digunakan pada tahap selanjutnya adalah bentonit yang dimodifikasi dengan asam HCl 2 M. Pada karakterisasi suhu, enzim direaksikan dengan substrat dan kromogen o-dianisidine pada kondisi pH 7 dan diinkubasi dengan variasi suhu. Suhu inkubasi yang digunakan antara lain: $30 \pm 2^\circ\text{C}$, 40°C , 50°C dan 60°C . Hasil inkubasi kemudian diukur pada panjang gelombang 525 nm. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Konsentrasi enzim yang digunakan adalah 17,922 IU/ml.

Tabel 3 Pengaruh variasi suhu terhadap aktivitas enzim GOD terimobilisasi bentonit dan GOD bebas

Variasi suhu	30±2°C		40°C		50°C		60°C	
	i	b	i	b	i	b	i	b
Rata-rata konsentrasi glukosa (mmol/L)	0,246	0,454	0,240	0,428	0,206	0,351	0,101	0,219
Aktivitas (mmol/L.min)	0,004	0,008	0,004	0,007	0,003	0,006	0,002	0,004
Aktivitas Spesifik (mmol/L.min.mg)	0,059	0,145	0,057	0,136	0,049	0,112	0,024	0,070

Ket: i = GOD terimobil; b = GOD bebas

Dapat dikatakan bahwa proses imobilisasi yang dilakukan tidak mempengaruhi suhu terbaik bagi enzim GOD untuk bekerja mengubah substrat glukosa menjadi produk glukonolakton.

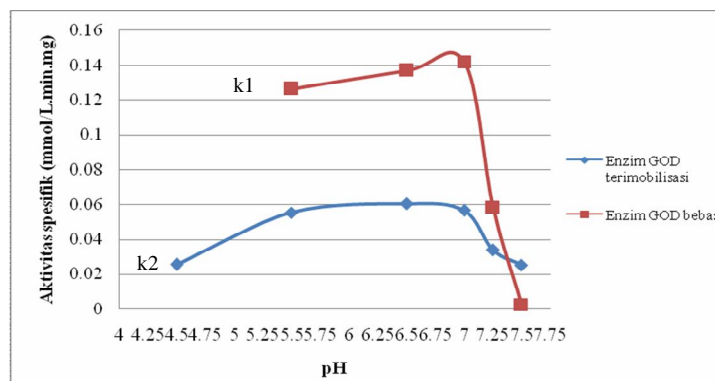
Apabila dilihat dari hasil percobaan yang diperoleh, maka terlihat adanya penurunan jumlah glukosa yang dikonsumsi enzim dari suhu 30±2°C hingga 60°C. Selain itu, dapat juga dilihat adanya penurunan nilai aktivitas enzim terimobilisasi dari suhu 30±2°C hingga 60°C. Adanya penurunan ini kemungkinan dikarenakan pada suhu di atas 30±2°C, struktur enzim menjadi terganggu akibat panas yang diberikan. Panas yang diberikan pada enzim, dapat menyebabkan terputusnya ikatan-ikatan yang terdapat pada enzim, sehingga menyebabkan struktur 3D enzim menjadi terganggu. Hal ini dapat menyebabkan perubahan pada sisi aktif enzim yang berdampak pada penurunan aktivitas enzim.

4.1.3 Penentuan pH terbaik

Dari hasil karakterisasi suhu kemudian dipilih suhu terbaik yang kemudian digunakan pada tahap-tahap selanjutnya. Suhu inkubasi yang digunakan pada tahap karakterisasi pH adalah 30±2°C. Karakterisasi pH dilakukan dengan mereaksikan enzim terimobilisasi dengan substrat dan kromogen o-dianisidine pada suhu 30±2°C dan variasi pH. Variasi pH yang digunakan antara lain: 4,5, 5,5, 6,5, 6,75, 7, 7,25 dan 7,5. Absorbansi dari produk yang terbentuk dari reaksi yang terjadi kemudian diukur pada panjang gelombang 525 nm. Tabel 4 dan gambar 3 menunjukkan hasil penentuan pH terbaik yang dilakukan.

Tabel 4 Pengaruh variasi pH terhadap aktivitas enzim GOD terimobilisasi bentonit

Variasi pH	4,5	5,5	6,5	6,75	7	7,25	7,5
Rata-rata konsentrasi glukosa (mmol/L)	0,107	0,231	0,252	0,224	0,237	0,141	0,105
Aktivitas (mmol/L.min)	0,002	0,004	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002
Aktivitas Spesifik (mmol/L.min.mg)	0,025	0,055	0,060	0,053	0,057	0,034	0,025



Gambar 3. Kurva pengaruh pH terhadap aktivitas spesifik enzim GOD terimobilisasi dan bebas

Aktivitas enzim GOD terimobilisasi kemudian meningkat pada pH 5,5 hingga 7, namun turun kembali pada pH 7,25 dan 7,5. pH 5,5 hingga 7 dapat dikatakan sebagai pH terbaik untuk kerja enzim GOD terimobilisasi bentonit termodifikasi asam.

4.1.4 Penentuan K_m dan V_{max}

Setelah diketahui pH dan suhu terbaik dari enzim GOD terimobilisasi bentonit termodifikasi asam HCl 2 M, kemudian dilakukan penentuan K_m dan V_{max} . Penentuan K_m dan V_{max} dilakukan dengan mereaksikan enzim terimobilisasi dengan variasi konsentrasi substrat glukosa. Pada tahapan ini, digunakan 7 variasi konsentrasi glukosa, yaitu: 1%, 2%, 3%, 6%, 9%, 12% dan 15%. Masing-masing variasi glukosa dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Hasil konsentrasi glukosa yang diperoleh kemudian dirata-rata dan digunakan dalam penentuan K_m dan V_{max} . Penentuan K_m dan V_{max} dilakukan dengan menggunakan persamaan Lineweaver-Burk. Berdasarkan persamaan ini, maka akan diperoleh data seperti yang ditunjukkan pada tabel 5. Dari data tersebut, maka diperoleh nilai V_{max} sebesar 0,2537 mg/L.min dan K_m sebesar 5471,7507 mg/ L.

Tabel 5 Penentuan K_m dan V_{max} enzim GOD terimobilisasi bentonit

Glukosa (%)	Konsentrasi H_2O_2 (mg/L)	[S](mg/L)	1/[S]	V (mg/L.min)		1/V	
				i	b	i	b
1	4,026	5000	$2,0 \times 10^{-4}$	0,067	0,12	14,905	8,20
2	5,874	10000	$1,0 \times 10^{-4}$	0,098	0,16	10,215	6,12
3	7,360	15000	$6,7 \times 10^{-5}$	0,123	0,18	8,152	5,49
6	8,284	30000	$3,3 \times 10^{-5}$	0,138	0,21	7,243	4,81
9	9,208	45000	$2,2 \times 10^{-5}$	0,153	0,22	6,516	4,51
12	9,690	60000	$1,7 \times 10^{-5}$	0,162	0,24	6,192	4,25
15	9,730	75000	$1,3 \times 10^{-5}$	0,162	0,25	6,166	3,97

Ket: i = GOD terimobil; b = GOD bebas

4.1.5 Penentuan Cycle Pemakaian Maksimum Enzim Terimobilisasi bentonit-asam

Penentuan ini dilakukan dengan cara mereaksikan enzim terimobilisasi yang sama dengan substrat dan kromogen o-dianisidine sebanyak n kali hingga aktivitas enzim menunjukkan penurunan yang signifikan apabila dibandingkan dengan aktivitas enzim terimobilisasi awal. Tabel 6 menunjukkan aktivitas dari enzim terimobilisasi yang digunakan sebanyak 7 kali *cycle*.

Tabel 6. Penentuan *cycle* pemakaian maksimum dari enzim GOD terimobilisasi bentonit-asam

Cycle	Konsentrasi glukosa (mmol/L)	Aktivitas (mmol/L.min)	Aktivitas Spesifik (mmol/L.min.mg)	% Penurunan aktivitas spesifik
1	0,179	$3,0 \times 10^{-3}$	0,043	0
2	0,164	$2,7 \times 10^{-3}$	0,039	9,302
3	0,161	$2,7 \times 10^{-3}$	0,038	11,628
4	0,151	$2,5 \times 10^{-3}$	0,036	16,279
5	0,148	$2,5 \times 10^{-3}$	0,035	18,605
6	0,144	$2,4 \times 10^{-3}$	0,035	18,605
7	0,124	$2,1 \times 10^{-3}$	0,030	30,232

Dari data yang diperoleh, diketahui bahwa terjadi penurunan konsentrasi glukosa yang digunakan dalam reaksi dari pemakaian enzim terimobilisasi pertama hingga pengulangan ke-7. Secara umum dapat disimpulkan bahwa enzim GOD yang terimobilisasi bentonit termodifikasi asam ini cukup stabil apabila dibandingkan dengan metode adsorpsi karena berdasarkan penelitian.

4.2. Imobilisasi Enzim GOD Pada Bentonit Termodifikasi Surfaktan (TMA-OH)

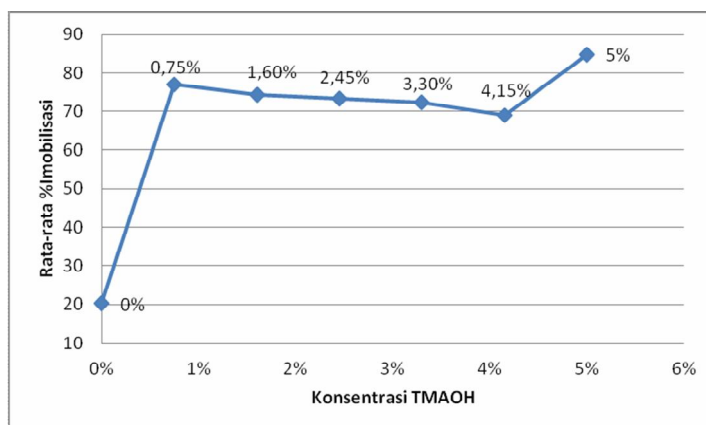
Imobilisasi enzim GOD pada bentonit termodifikasi surfaktan dengan variasi konsentrasi 0,75% hingga 5% dilakukan dengan konsentrasi enzim awal tertentu. Penentuan konsentrasi enzim awal dan enzim tidak terimobilisasi dilakukan menggunakan metode Hartree Lowry.

Selain itu, dilakukan juga imobilisasi enzim GOD pada bentonit yang tidak dimodifikasi untuk melihat kemampuan imobilisasi bentonit sebelum dimodifikasi. Hasil imobilisasi enzim GOD pada bentonit tidak termodifikasi (TMAOH 0%) dan hasil imobilisasi enzim GOD pada bentonit termodifikasi (TMAOH 0,75% - 5%) dapat dilihat pada tabel 7 dan gambar 4.

Dari tabel 7 dan gambar 4, terlihat bahwa persentase imobilisasi semakin menurun dengan penambahan konsentrasi TMAOH dari 0,75% - 4,15%. Namun, pada konsentrasi TMAOH 5%, terjadi kenaikan persentase enzim terimobilisasi yang cukup tinggi. Enzim GOD terimobilisasi pada TMAOH 5% akan dikarakterisasi suhu, pH, nilai K_m dan V_{max} -nya, serta ditentukan berapa kali jumlah pemakaiannya hingga mencapai penurunan aktivitas 50%.

Tabel 7. Persentase Imobilisasi Enzim GOD

[TMAOH]	[Enzim] Awal (IU/ml)			[Enzim] Terimobilisasi (IU/ml)			% imobilisasi		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0%	10,138	10,138	10,138	1,282	2,106	2,747	12,65	20,78	27,10
0,75%	17,922	17,922	10,138	13,645	13,828	7,875	76,13	77,16	77,68
1,60%	17,922	17,922	10,138	12,546	13,187	8,059	70,00	73,58	79,49
2,45%	17,922	17,922	10,138	12,363	13,462	7,692	68,98	75,11	75,87
3,30%	17,922	16,365	10,138	13,095	11,722	7,326	73,07	71,62	72,26
4,15%	17,922	16,365	10,138	13,462	10,165	7,051	75,11	62,11	69,55
5%	17,922	16,365	10,138	14,835	13,553	8,974	82,78	82,82	88,52

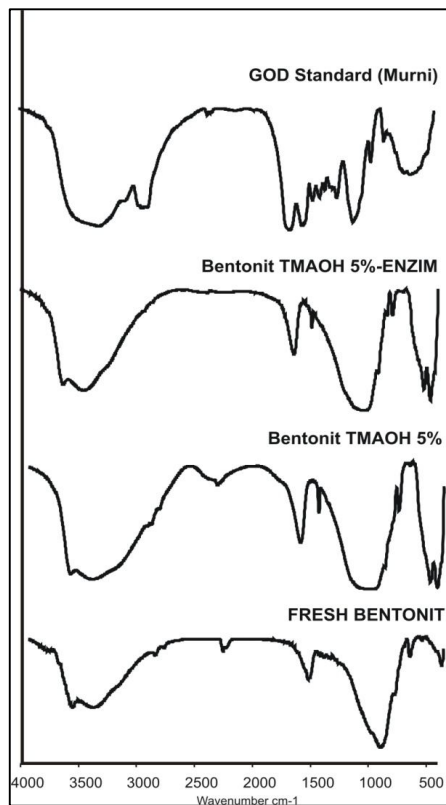


Gambar 4. Grafik Pengaruh Konsentrasi Surfaktan Terhadap %Imobilisasi

4.2.1 Karakterisasi struktur matriks GOD-bentonit termodifikasi surfaktan

Pada bagian ini akan dibahas pengaruh perlakuan bentonit alam menggunakan larutan surfaktan TMAOH 5% terhadap perubahan struktur bentonit alam dan kemampuan menyerap sejumlah enzim GOD dalam struktur lapisannya (gambar 5).

Pada bentonit-TMAOH 5% menunjukkan perubahan struktur pada bentonit alam, hal ini ditandai dengan berubahnya puncak utama ikatan O-Si-O pada daerah serapan 1000-1060 cm^{-1} yang semakin lebar dan intensitasnya semakin tinggi. Puncak serapan ini menunjukkan vibrasi simetri ikatan O-Si-O pada struktur bentonit-TMAOH 5%. Melebarnya serapan ini



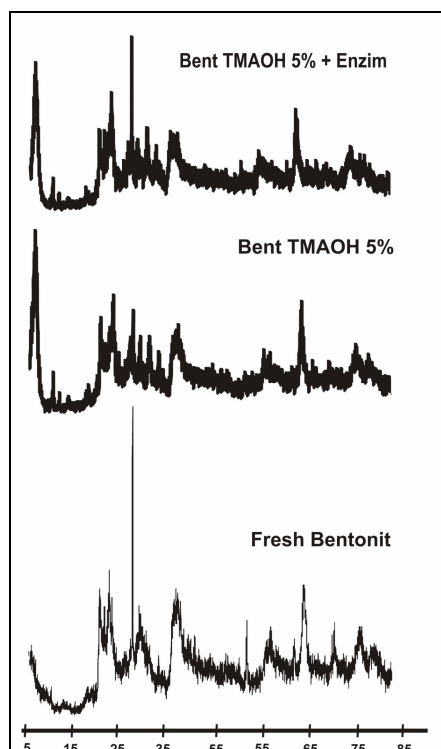
disebabkan adanya interaksi antara gugus O-Si bentonit dengan atom O dari gugus OH dari TMAOH. Hal ini diperkuat dengan munculnya puncak serapan pada $400-550\text{ cm}^{-1}$ yang merupakan daerah fingerprint dan double ring. Serapan ini menunjukkan adanya pembentukan pori/meningkatnya jarak antar lapisan bentonit. Munculnya puncak serapan pada $800-850\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan vibrasi asimetri eksternal ikatan Si-O-Si antara dua tetrahedral SiO_4 pada struktur bentonit. Pada gambar 3 tampak adanya perubahan karakter puncak serapan daerah tersebut antara bentonit-TMAOH 5% dan bentonit-TMAOH 5%+GOD. Munculnya puncak serapan pada 800 cm^{-1} menunjukkan adanya interaksi antara bentonit dengan enzim GOD. Puncak serapan pada 1550 cm^{-1} merupakan vibrasi *stretching* simetri ikatan C-C dari TMAOH yang menunjukkan masuknya molekul TMAOH kedalam struktur lapisan bentonit.

Melebarnya puncak serapan pada daerah $3300-3600\text{ cm}^{-1}$ merupakan vibrasi *stretching* simetri ikatan O-H yang berasal dari interaksi antara gugus O-Si-O bentonit dengan gugus O-H dari TMAOH. Semakin lebar dan tingginya intensitas serapan tersebut menunjukkan semakin banyak interaksi antara bentonit dengan TMAOH.

Gambar 5 : Spektrogram FTIR bentonit alam dengan perlakuan larutan surfaktan TMAOH 5% dan immobilisasi enzim GOD dalam bentonit- TMAOH 5% .

Pada bentonit TMAOH 5%-GOD menunjukkan perubahan karakter serapan pada daerah puncak utama pada $950-1050\text{ cm}^{-1}$ ikatan O-Si-O dari bentonit TMAOH 5% menjadi lebih sempit setelah mengikat enzim GOD. Hal ini disebabkan adanya pemutusan ikatan antara O-Si- bentonit dengan gugus O-H dari TMAOH karena masuknya enzim GOD. Namun penurunan ini tidak banyak karena dimungkinkan ukuran molekul enzim GOD yang besar mengakibatkan hanya sejumlah kecil yang dapat masuk kedalam sturktur lapisan bentonit-TMAOH 5%. Fenomena ini diperkuat dengan menyempitnya puncak serapan pada $3300-3600\text{ cm}^{-1}$ untuk vibrasi ikatan O-H. Hal ini disebabkan karena berkurangnya interaksi antara gugus O-Si-O bentonit dengan gugus O-H dari TMAOH yang telah digantikan oleh GOD.

Perubahan kristalinitas bentonit alam sebagai pengaruh perlakuan larutan TMAOH 5% dapat diamati dari difraktogram sinar-X yang diberikan pada gambar 6. Pada gambar tersebut tampak berkurangnya kristalinitas kwarsa yang ditandai dengan berkurangnya puncak utama difraksi kwarsa pada $2\theta = 28,02$. Sedangkan puncak utama bentonit pada $2\theta = 6,37$ derajat, meningkat intensitasnya. Hal ini disebabkan karena adanya molekul TMAOH yang masuk kedalam struktur antar lapisan bentonit mengakibatkan rusaknya sebagian struktur bidang kristal kwarsa. Masuknya TMAOH kedalam lapisan bentonit mengakibatkan perubahan jarak antar lapisan bentonit yaitu dari $d = 8,54\text{ \AA}$ pada fresh bentonit menjadi $d = 13,86\text{ \AA}$ ($2\theta = 6,37$ derajat) pada bentonit-TMAOH 5%. Namun dibandingkan dengan bentonit HCl 2M harga jarak antar lapisan (d) bentonit-TMAOH 5% relative lebih kecil, hal ini disebabkan ukuran molekul TMAOH yang besar mempengaruhi orientasi molekul TMAOH kearah horizontal. Pada bentonit TMAOH 5%+GOD jarak antar lapisan (d) tersebut relative tidak berbeda dengan bentonit TMAOH 5%. Hal ini menunjukkan keberadaan molekul TMAOH dalam struktur lapisan bentonit mencegah masuknya enzim GOD kedalam struktur lapisan bentonit.



Gambar 6 : Difraksi sinar-X perubahan struktur bentonit alam menjadi matriks enzim GOD terimobilisasi pada bentonit-TMAOH 5%

Tabel 8 : Harga 2θ , d dan intensitas puncak difraksi bentonit alam termodifikasi TMAOH 5% dan enzim GOD.

SAMPEL	2θ	d (Å)	I (count)
Fresh Bentonit	5,92	8,54	355
Bent.-TMAOH 5%	6,37	15,26	194
Bent.- TMAOH 5%+GOD	5,78	13,86	231

Hasil adsorpsi enzim GOD pada bentonit TMAOH 5% adalah 13,5 IU/ml (berkisar 83% dari jumlah awal Enzim GOD dalam larutan). Untuk jumlah enzim GOD teradsorp pada fresh bentonit dan bentonit HCl 2M adalah 2,11 IU/ml (sekitar 20% dari jumlah awal Enzim GOD dalam larutan) dan 17,92 IU/ml (berkisar 100% dari jumlah awal Enzim GOD dalam larutan). Hasil adsorpsi ini semakin memperkuat dugaan adanya pengaruh TMAOH dalam bentonit menghalangi masuknya enzim GOD kedalam lapisan bentonit.

Tabel 9 : Hubungan harga d dan intensitas puncak difraksi bentonit alam termodifikasi HCl 2M dan TMAOH 5% terhadap kemampuan adsorpsi terhadap enzim GOD.

SAMPEL	d (Å)	I (count)	GOD teradsorp (IU/ml)
Fresh Bentonit	8,54	355	2,11
Bent.-HCl 2M + GOD	15,26	161	17,92
Bent.- TMAOH 5%+GOD	13,86	231	13,5

Dari pembahasan diatas berdasarkan kajian FTIR, XRD dan adsorpsi enzim GOD dapat disimpulkan bahwa bentonit HCl 2M memiliki performa material yang lebih baik dibandingkan bentonit TMAOH 5%. Hal ini dibuktikan dengan kemampuan adsorpsi material bentonit HCl 2M terhadap enzim GOD lebih tinggi dari bentonit TMAOH 5%.

4.2.2 Penentuan Suhu Terbaik

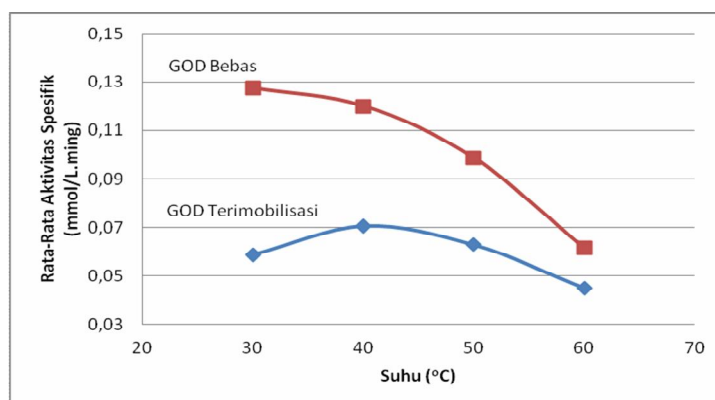
Penentuan suhu terbaik dilakukan dengan uji aktivitas, dimana dilakukan pengukuran terhadap produk (H_2O_2) yang dihasilkan. Produk (H_2O_2) yang dihasilkan diketahui dari absorbansi hasil reaksi pada panjang gelombang 525nm, dan dimasukkan ke persamaan regresi linier kurva standard uji aktivitas. Pada persamaan reaksinya, jumlah mol H_2O_2 yang dihasilkan setara dengan jumlah mol glukosa yang dikonversi, sehingga dapat dikatakan bahwa konsentrasi produk (mmol/L) yang dihasilkan sama dengan konsentrasi glukosa (mmol/L) yang dikonversi oleh enzim GOD terimobilisasi. Enzim terimobilisasi yang digunakan untuk tahap ini adalah enzim terimobilisasi dari hasil imobilisasi replikasi ke-2 yang telah dicuci sebanyak 4x, menghasilkan enzim terimobilisasi sebanyak 13,553 IU/ml atau setara dengan 0,05274 mg enzim. Karena protein yang terdapat dalam campuran reaksi hanyalah enzim, maka massa enzim sama dengan massa protein.

Tabel 9 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas GOD Terimobilisasi dan GOD bebas

Replikasi	Konsentrasi glukosa yang dikonversi (mmol/L)							
	30 °C		40 °C		50 °C		60 °C	
	i	b	i	b	i	b	i	b
1	0,172	0,444	0,214	0,409	0,179	0,342	0,125	0,211
2	0,189	0,469	0,239	0,455	0,225	0,352	0,157	0,228
3	0,196	0,448	0,218	0,420	0,193	0,359	0,143	0,218
Rata-Rata	0,186	0,454	0,224	0,428	0,199	0,351	0,142	0,219
Aktivitas (mmol/L.min)	$3,10 \cdot 10^{-3}$	$7,57 \cdot 10^{-3}$	$3,73 \cdot 10^{-3}$	$7,13 \cdot 10^{-3}$	$3,31 \cdot 10^{-3}$	$5,85 \cdot 10^{-3}$	$2,37 \cdot 10^{-3}$	$3,65 \cdot 10^{-3}$
Aktivitas Spesifik (mmol/L.min.mg)	$5,87 \cdot 10^{-2}$	0,127	$7,07 \cdot 10^{-2}$	0,120	$6,28 \cdot 10^{-3}$	$9,85 \cdot 10^{-2}$	$4,49 \cdot 10^{-3}$	$6,14 \cdot 10^{-2}$

Ket: i = GOD terimobil; b = GOD bebas

Dari tabel 9 dan gambar 7, terlihat bahwa titik puncak konsentrasi glukosa yang dioksidasi oleh enzim GOD terimobilisasi berada pada suhu 40°C, dan mengalami penurunan di kedua sisinya, yaitu pada suhu 30°C, dan suhu 50°C dengan aktivitas terendah pada suhu 60 °C. Hal ini menunjukkan suhu terbaik untuk aktivitas enzim GOD terimobilisasi pada bentonit termodifikasi TMAOH 5% adalah pada suhu 40-50 °C.



Gambar 7. Grafik Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Spesifik Enzim GOD

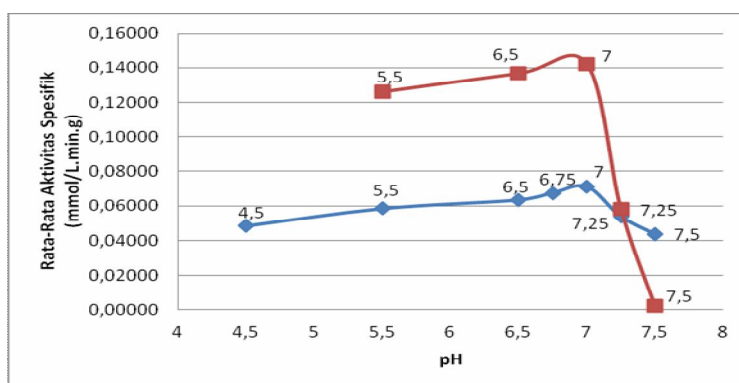
4.2.3. Penentuan pH Terbaik

Enzim terimobilisasi yang digunakan untuk tahap ini adalah enzim terimobilisasi dari hasil imobilisasi replikasi ke-2 yang telah dicuci sebanyak 5x, menghasilkan enzim terimobilisasi sebanyak 11,107 IU/ml atau setara dengan 0,04322 mg enzim. Selain itu, dilakukan pula penentuan pH terbaik untuk enzim GOD bebas, dengan cara uji aktivitas yang sama dengan penentuan pH terbaik untuk enzim GOD terimobilisasi. Namun, untuk penentuan pH terbaik enzim bebas ini, hanya dilakukan pada pH 5,5; 6,5; 7; 7,25; dan 7,5.

Dari tabel 10 dan gambar 8 terlihat bahwa kenaikan pH dari pH 4,5 hingga pH 7 diikuti kenaikan aktivitas spesifik enzim GOD terimobilisasi. Setelah pH 7 (pH 7,25 – 7,5) terjadi penurunan konsentrasi glukosa yang dioksidasi oleh enzim GOD. Aktivitas spesifik rata-rata yang paling tinggi untuk penentuan pH terbaik enzim bebas adalah pada pH 7., sehingga pH 7 merupakan kondisi yang terbaik untuk aktivitas enzim GOD terimobilisasi pada bentonit termodifikasi TMAOH 5%.

Tabel 10. Pengaruh pH Terhadap GOD Terimobilisasi dan GOD bebas

Aktivitas Spesifik (mmol/L.min.mg)	pH						
	4,5	5,5	6,5	6,75	7	7,25	7,5
GOD Terimobilisasi	$4,84.10^{-2}$	$5,84.10^{-2}$	$6,34.10^{-2}$	$6,75.10^{-2}$	$7,12.10^{-2}$	$5,39.10^{-2}$	$4,38.10^{-2}$
GOD bebas	n/a	0,118	0,148	n/a	0,142	$5,51.10^{-2}$	$2,19.10^{-3}$



Gambar 8. Grafik Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Spesifik Enzim GOD

4.2.4 Penentuan nilai K_m dan V_{max}

Penentuan nilai K_m dan V_{max} dilakukan dengan uji aktivitas enzim terimobilisasi menggunakan konsentrasi glukosa yang bervariasi, yaitu 1% hingga 15% (b/v). Konsentrasi enzim yang digunakan untuk GOD terimobilisasi adalah 11,107 IU/ml sedangkan untuk GOD bebas adalah 10,138 IU/ml atau setara dengan 0,03945 mg enzim. Kecepatan reaksi ditentukan dari konsentrasi H_2O_2 yang terbentuk dibagi waktu reaksi. Dengan rumus regresi, untuk GOD terimobilisasi diperoleh $y = 26142x + 5,8904$, sehingga nilai $V_{max} = 0,169768$ ppm/min, dan nilai $K_m = 4438,069$ ppm. Sedangkan untuk enzim GOD bebas diperoleh $y = 19685x + 4,7048$, maka nilai $V_{max} = 0,212549$ ppm/min, dan nilai $K_m = 4184,025$ ppm. Apabila dibandingkan antara enzim GOD bebas dengan enzim GOD terimobilisasi, terlihat bahwa dengan konsentrasi enzim yang hampir sama, nilai K_m dari enzim GOD terimobilisasi lebih besar dibandingkan dengan nilai K_m dari enzim GOD bebas. Sedangkan, nilai V_{max} enzim GOD bebas lebih besar dibandingkan dengan nilai V_{max} enzim GOD terimobilisasi.

Tabel 11. Penentuan nilai K_m dan V_{max} Enzim GOD Terimobilisasi dan GOD bebas

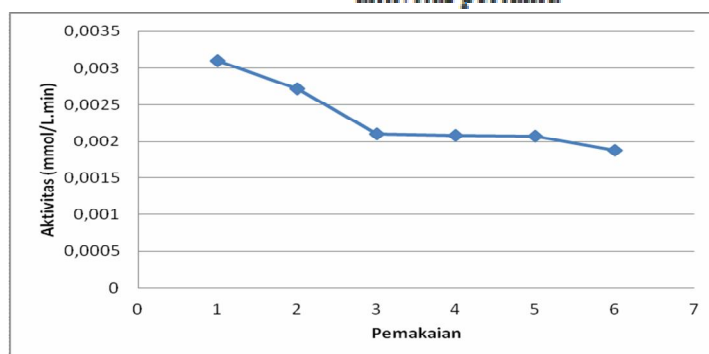
% glukosa	[S](ppm)	1/[S]	Konsentrasi H_2O_2 dihasilkan (ppm)		V (ppm/min)		1/V	
			i	b	i	b	i	b
1%	5000	$2,00.10^{-4}$	5,47182	7,039	0,091	0,117	10,965	8,524
2%	10000	$1,00.10^{-4}$	6,87794	8,847	0,115	0,147	8,724	6,782
3%	15000	$6,67.10^{-5}$	7,68144	9,730	0,128	0,162	7,811	6,166
6%	30000	$3,33.10^{-5}$	8,84651	10,775	0,147	0,180	6,782	5,569
9%	45000	$2,22.10^{-5}$	9,20808	11,458	0,153	0,191	6,516	5,237
12%	60000	$1,67.10^{-5}$	9,77053	12,261	0,163	0,204	6,141	4,893
15%	75000	$1,33.10^{-5}$	9,81071	12,864	0,164	0,214	6,116	4,664

Ket: i = GOD terimobil; b = GOD bebas

4.2.5. Penentuan Jumlah Pemakaian Maksimum (cycle) GOD Terimobilisasi Pada Bentonit Termodifikasi Surfaktan

Penentuan jumlah pemakaian maksimum enzim GOD terimobilisasi dilakukan dengan menggunakan 10 µl enzim terimobilisasi untuk diuji aktivitasnya berulang kali hingga diperoleh penurunan aktivitas hingga 50%.

$$\% \text{penurunan aktivitas} = \frac{(\text{aktivitas pertama} - \text{aktivitas pemakaian ke } n) \times 100\%}{\text{aktivitas pertama}}$$



Gambar 9. Grafik Jumlah Pemakaian GOD Terimobilisasi

Dari gambar 9 terlihat bahwa penurunan aktivitas banyak terjadi dari pemakaian pertama hingga ketiga. Hal ini mungkin terjadi karena enzim diimobilisasi dengan sistem adsorpsi sehingga enzim tidak terikat cukup kuat pada bentonit dan enzim yang terdapat di bagian permukaan sebelah luar mudah terlepas saat diberi perlakuan tertentu. Sedangkan setelah pemakaian ketiga, enzim yang tersisa pada bentonit sudah cukup stabil terjebak dalam pori-pori bentonit sehingga *leaching* hanya terjadi dalam jumlah yang kecil.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian tahun I yang telah selesai dikerjakan dapat diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Bentonit termodifikasi HCl dan surfaktan TMA-OH dapat digunakan sebagai matriks pengimobilisasi enzim GOD. Modifikasi terbaik ditunjukkan pada hasil imobilisasi tertinggi. Hasil terbaik ditunjukkan pada modifikasi dengan HCl 2M dan TMAOH 5%.
2. Suhu terbaik enzim GOD terimobilisasi bentonit termodifikasi HCl adalah $30 \pm 2^\circ\text{C}$ dan 40°C , dan pH terbaik sebesar 5,5-7. sedangkan untuk GOD terimobilisasi pada bentonit termodifikasi TMAOH 5% adalah pada suhu $40-50^\circ\text{C}$, dan pH 7.
3. Proses imobilisasi berpengaruh pada nilai K_m dan V_{max} dari enzim GOD. Nilai V_{max} dari enzim terimobilisasi bentonit-asam sebesar 0,183 ppm/min dan nilai K_m 8609,12 ppm. Sedangkan enzim terimobilisasi surfaktan, V_{max} adalah 0,169768 ppm/menit, dan (K_m) adalah 4438,069 ppm.
4. Enzim GOD terimobilisasi bentonit termodifikasi HCl memiliki kestabilan yang cukup tinggi karena dapat digunakan sebanyak 7 kali pemakaian dengan penurunan aktivitas spesifik sebesar $\pm 30\%$, sedangkan GOD terimobilisasi pada bentonit termodifikasi TMAOH 5% dapat digunakan sebanyak 6x hingga aktivitasnya menurun sebanyak 39,44%.
5. Berdasarkan kajian struktural menggunakan data analisa FTIR, XRD dan adsorpsi enzim GOD dapat disimpulkan bahwa bentonit HCl 2M memiliki performa material yang lebih baik dibandingkan bentonit TMAOH 5%. Hal ini dibuktikan dengan kemampuan adsorpsi material bentonit HCl 2M terhadap enzim GOD lebih tinggi dari bentonit TMAOH 5%.

Daftar Pustaka

1. Ad'anyi N, T'oth-Markus M, Szab'ó EE, V'aradi M, Sammartino MP, Tomassetti M and Campanella L, Investigation of organic phase biosensor for measuring glucose in flow injection analysis system. *Analytica Chimica Acta* 501:219–225 (2004).
2. Arief B., 2002, Metode Pillarisasi dan Interkalasi Lempung, *Jurnal Teknologi Industri dan Informasi*, vol. 3, No. 1, UBAYA, Surabaya, 35-42.
3. Atia, K.S. and AI El-Batal, Preparation of glucose oxidase immobilized in different carriers using radiation Polymerization, *J Chem Technol Biotechnol* 80:805–811 (2005)
4. Arief B., 2004, Pillarization of Natural Bentonite Clay Using Al and Fe Through CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) Intercalation, Prosiding Seminar Nasional Kimia, Universitas Gadjah Mada, ISSN : 1410-8313, Oktober 2004.
5. Arief B., Hadiatni Rita, P., Yanti dan Dina Kartika, 2003, Pillarisasi bentonite Clay dan Aplikasinya dalam Penghilangan Warna pada Limbah Industri Tekstil, Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia Indonesia 2003 di Yogyakarta, ISBN : 979-97893-0-3, KR-17.
6. Arief Budhyantoro, Restu Kartiko Widi, Emma Savitri, Pillarisation of Natural Bentonite with Mixed Metal Fe-Al And Its Application in Chromium Ion Adsorption, 12th Asian Chemical Congress, Federation of Asian Chemical Societies, Kuala Lumpur, Malaysia (accepted, February 2007)
7. Chibata, I., "Immobilized Enzymes. Research and Development", Wiley, New York, 1978.
8. Cirpan, A., S. Alkan, L. Toppare, Y. Hepuzer, Y. Yagci, *Bioelectrochemistry* 59 (2003) 29.
9. Cool, P. and Vansant, E.F., 1998, Pillare Clays: Preparation, Characterization and Applications, *Accademic Press*, Antwerp, Belgia.
10. Clearfield, A., 1998, Organikally Pillared Micro-and Mesoporous Materials, *Chem.Mater*, Vol.10, 2801-2810.
11. Davis, R.D., Gilman, J.W., Sutto, T.E., Callahan, J.H., Trulove, P.C. And De Long, H.C., 2004, Improved Thermal Stability Of Organikally Modified Layered Silicates, Clays and Clay Minerals, Vol. 52, No. 2, 171–179.
12. Elena A. Markvicheva, Vladimir I. Lozinsky, Fatima M. Plieva, Konstantin A. Kochetkov, Lev D. Rumsh, Vitali P. Zubov, Jyotirmoy Maity, Rajesh Kumar, Virinder S. Parmar, and Yury N. Belokon, Gel-immobilized enzymes as promising biocatalysts: *Pure Appl. Chem.*, Vol. 77, No. 1, pp. 227–236, 2005.
13. He. H., Frost, R.L., Deng, F., Zhu, J., Wen, X. And Yuan, P., 2004, Conformation Of Surfactant Molecules In The Interlayer Of Montmorillonite Studied By 13c Mas NMR, Clays And Clay Minerals, Vol. 52, No. 3, 350–356,
14. Isik, S., S. Alkan, L. Toppare, I. Cianga, Y. Yagci, *Eur. Polym. J.* 39 (2003) 2375.
15. Iwuoha EI and Smyth MR, Reactivity of a glucose oxidase electrode in a polar organic solvent. *Anal Proc Incl Anal Commun* 31:19–21 (1994).
16. Laane C, Boeren S, Vos Kand Veeger C, Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents, *Biotechnol Bioeng* 30:81–87 (1987).
17. Larreta-Garde V, Xu ZF, Biton J and Thomas D, Stability of enzymes in low water activity media, in *Biocatalysis in OrganicMedia*, ed by Laane C, Tramper J and Lilly MD. Elsevier, Amsterdam, pp 137–146 (1987).
18. Mozhaev VV, Khmelnitsky YL, Sergeeva MV, Belova AB, Klyachko NL, Levashov AV and Martinek K, Catalytic activity and denaturation of enzymes in water/organic cosolvent mixtures: α -chymotrypsin and laccase in mixed water/alcohol, water/glycol and water/formamide solvents. *Eur J Biochem* 184:597–602 (1989).
19. Raba, J., Mottola, H.A. 1995. Glucose Oxidase as an Analytical Reagent. *Critical Reviews in Analytical Chemistry Vol* 25(1):1–42
20. Reslow M, Adlercreutz P and Mattiasson B, Organic solvents for bioorganic synthesis 1. Optimization of parameters for a chymotrypsin catalyzed process. *Appl Microbiol Biotechnol* 26:1–8 (1987).
21. Restu Kartiko Widi, Arief Budhyantoro, Effect of HDTMA on Pillarisation of Bentonite with Metal Fe And Its Application in Copper Ion Adsorption, 12th Asian Chemical Congress, Federation of Asian Chemical Societies Kuala Lumpur, Malaysia (accepted, February 2007)
22. Sanjay, G., S. Sugunan, Invertase immobilised on montmorillonite: reusability enhancement and reduction in leaching, *Catalysis Communications* 6 (2005) 81–86
23. Sarath Babu VR, Kumarb MA, Karanth NG and Thakur MS, Stabilization of immobilized glucose oxidase against thermal inactivation by silanization for biosensor applications, *Biosensors and Bioelectronics* 19:1337–1341(2004).

24. Sarikaya, Y., Önal M., Baran, B. and Alemdaroğlu, T., 2000, The Effect of Treatment on Some The Physicochemical Properties of a Bentonite, *Clays and Clay Minerals*, Vol. 48, No. 5, 557-562.
25. Trevan, M.D., "Immobilized Enzymes. An Introduction and Applications in Biotechnology", Wiley, New York, 1980.
26. Tsuge H, Natsuakai O and Ohashi K, Purification, properties and molecular features of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J Biochem* 78:835–843 (1975).
27. US Patent no. 5610113 (1997), Patent Storm, issued on March 11, 1997
28. US Patent no. 6495511 (2001), Patent Storm, issued on December 17, 2001
29. Vasant R. Choudary, Suman K. Jana, Nilesh S. Patil, 2001, *Catal. Lett.* Vol. 76, no. 3-4, pp. 235-239
30. Vasileva N and Godjevargova Ts, Study of the effect of some organic solvents on the activity and stability of glucose oxidase. *Materials Science and Engineering C* 25:17–21 (2005).
31. Vasilios, G., Dimitrios, G. and Dimitrios, P., 2001, Organo-Clay Derivatives in the Synthesis of Macrocycles, *WILEY-VCH Verlag GmbH*, Weinheim, Nederland.
32. Whitaker, J.R., A.G.J. Voragen, D.W.S Wong. 2003. Handbook of Food Enzymology. Marcel Dekker, Inc. New York
33. Worsfold P. J ., Iupac Classification And Chemical Characteristics Of Immobilized Enzymes, *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 67, No. 4, pp. 597-600, 1995.

**LAPORAN PENELITIAN TAHUN I
HIBAH BERSAING PERGURUAN TINGGI
Tahun Anggaran 2012/2013**



**PEMBUATAN *WAFER* ENZIM GLUKOSA OKSIDASE TERIMOBILISASI
PADA BENTONIT ALAM TERMODIFIKASI DAN PEMANFAATANNYA
SEBAGAI BIOKATALIS DALAM BIOREAKTOR**

**Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D
Arief Budhyantoro, S.Si., M.Si.
Ruth Chrisnasari S.TP., M.P**

**UNIVERSITAS SURABAYA
NOPEMBER, 2012**

HALAMAN PENGESAHAN USUL HIBAH BERSAING

1. Judul : Pembuatan *Wafer* Enzim Glukosa Oksidase
Terimobilisasi Pada Bentonit Alam
Termodifikasi dan Pemanfaatannya Sebagai
Biokatalis dalam Bioreaktor
2. Ketua Peneliti
- a. Nama lengkap : Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D
- b. Jenis Kelamin : Laki-laki
- c. NPK : 199024
- d. Jabatan Struktural : -
- e. Jabatan Fungsional : Lektor, III d
- f. Fakultas/Jurusan : Departemen MIPA
- g. Pusat Penelitian/Perguruan Tinggi : Universitas Surabaya
- h. Alamat : Jl. Raya Kalirungkut Tenggilis Gd TG Lt. 6
Surabaya
- i. Telp./Faks : 031- 2981398 / 031-2981387
- j. Alamat Rumah : Jl. Jambangan Kebon Agung 1A/6 Surabaya
- k. Telp./Faks/email : 081615260956/restu@ubaya.ac.id
3. Jangka Waktu Penelitian : 2 tahun
4. Pembiayaan
- a. Jumlah biaya yang diajukan ke Dikti : Rp. 100.000.000,-
- b. - Jumlah biaya tahun ke 1 yang diajukan ke Dikti : Rp. 50.000.000,-
- Jumlah biaya tahun ke 2 yang diajukan ke Dikti : Rp. 50.000.000,-
- Jumlah biaya yang diajukan ke Instansi Lain : Rp. -

Surabaya, 15 Nopember 2012

Mengetahui,
Ketua Departemen MIPA

Ketua Peneliti,

(Joice Ruth Juliana, S.Si., M.Si)
NPK: 198033

(Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D)
NPK: 199024

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Surabaya

(Dr. Yoan Nursari Simanjuntak, SH, M.Hum.)
NPK: 196008

DAFTAR ISI

	Halaman
IDENTITAS PENELITIAN	1
ABSTRAK	1
BAB I. PENDAHULUAN.....	2
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
BAB III. METODE PENELITIAN.....	4
BAB IV. HASIL PENELITIAN.....	6
KESIMPULAN	18
DAFTAR PUSTAKA	19